

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

PCTWELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 5 : C12Q 1/68, C07K 15/28, 13/00 G01N 33/569	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 90/08197 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 26. Juli 1990 (26.07.90)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP90/00087 (22) Internationales Anmeldedatum: 17. Januar 1990 (17.01.90) (30) Prioritätsdaten: P 39 01 397.9 19. Januar 1989 (19.01.89) DE P 39 06 832.3 3. März 1989 (03.03.89) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BOEHRINGER MANNHEIM GMBH [DE/DE]; Sandhoferstr. 116, D-6800 Mannheim 31 (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): CHAKRABORTY, Trinad [SG/DE]; Friedrichstr. 12, D-8700 Würzburg (DE). GOEBEL, Werner [DE/DE]; Ravensburgstr. 2B, D-8707 Veitshöchheim (DE). NOTERMANS, Servatius, Hubertus, Wilhelmus [NL/NL]; Obrechtlaan 17, NL-3723 KA Bilthoven (NL).		(74) Anwälte: DAUM, Martin usw. ; Boehringer Mannheim GmbH, Sandhoferstr. 116, D-6800 Mannheim 31 (DE). (81) Bestimmungsstaaten: AT (europäisches Patent), AU, BE (europäisches Patent), CA, CH (europäisches Patent), DE (europäisches Patent), DK (europäisches Patent), ES (europäisches Patent), FR (europäisches Patent), GB (europäisches Patent), IT (europäisches Patent), JP, LU (europäisches Patent), NL (europäisches Patent), SE (europäisches Patent), US. Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i>
(54) Title: PROCESS FOR TESTING FOR PATHOGENIC LISTERIA BACTERIA (54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR BESTIMMUNG VON PATHOGENEN LISTERIA-BAKTERIEN (57) Abstract <p>Nucleic acids which preferably hybridize under hybridization conditions 5-6 x SSC and 42°C-60°C with the 2.5 kb large KpnI-BamHI fragment of pLM63, preferably a nucleic acid listed in Table III, and which contain reporter groups are suitable for hybridization tests on Listeria bacteria. Proteins suitable for producing antibodies against Listeria bacteria are also described.</p> (57) Zusammenfassung <p>Nucleinsäuren, welche vorzugsweise bei den Hybridisierungsbedingungen 5-6 x SSC und 42°C-60°C mit dem 2,5 kb großen KpnI-BamHI Fragment aus pLM63, vorzugsweise mit einer Nucleinsäure nach Tabelle III, hybridisieren. Derartige Nucleinsäuren sind, wenn sie Reportergruppen enthalten, für Hybridisierungstests auf Listeria-Bakterien geeignet. Ebenso werden Proteine beschrieben, welche zur Herstellung von Antikörpern gegen Listeria-Bakterien geeignet sind.</p>		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Code, die zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	ES	Spanien	ML	Mal
AU	Australien	FI	Finnland	MR	Mauritanien
BB	Barbados	FR	Frankreich	MW	Malawi
BE	Belgien	GA	Gabon	NL	Niederlande
BF	Burkina Faso	GB	Vereinigtes Königreich	NO	Norwegen
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	RO	Rumänien
BJ	Benin	IT	Italien	SD	Sudan
BR	Brasilien	JP	Japan	SE	Schweden
CA	Kanada	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SN	Senegal
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KR	Republik Korea	SU	Soviet Union
CG	Kongo	LI	Liechtenstein	TD	Tschad
CH	Schweiz	LK	Sri Lanka	TG	Togo
CM	Kamerun	LU	Luxemburg	US	Vereinigte Staaten von Amerika
DE	Deutschland, Bundesrepublik	MC	Monaco		
DK	Dänemark	MG	Madagaskar		

Verfahren zur Bestimmung von pathogenen *Listeria*-Bakterien

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Bestimmung von pathogenen *Listeria*-Bakterien, eine Nachweisnucleinsäure (probe) sowie ein Protein, welches zur Herstellung von Antikörpern gegen pathogene *Listeria*-Bakterien geeignet ist.

Listerien sind eine heterogene Gruppe grampositiver Bakterien und bestehen im wesentlichen aus den Spezies *Listeria monocytogenes*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri*, *L. ivanovii*, *L. grayi* und *L. murrayi*. Davon sind lediglich zwei Spezies pathogen, nämlich *L. monocytogenes* für Menschen und Tiere und *L. ivanovii* für Tiere. Die Listeriose äußert sich beim Menschen üblicherweise in einer bakteriellen Meningitis und Septikämie sowie bei Schwangeren in Fehl- und Totgeburten. Bei Schafen und Rindern äußert sich die Listeriose in Fehlgeburt, Enzephalitis, Septikämie und Mastitis (N. Engl. J. Med. 308 (1983), 203-206), J. Infec. 15 (1987), 165-168, Linnan, M.J. et al., An investigation of listeriosis in Southern California 1985, in Courtieu, A.L. et al., (eds) Listeriose, *Listeria*, Listeriosis 1985-1986, University of Nantes).

In jüngster Zeit wurde eine Häufung von Listeriose-Erkrankungen beim Menschen beobachtet, als deren Ursache die Kontamination von Milch und Käse, vor allem von Weichkäsesorten, durch *Listeria*-Bakterien als Ursache angesehen wird. Demzufolge ist eine Überprüfung von Lebensmitteln auf *Listeria*-Kontamination wichtig und in USA bereits für Käse vorgeschrieben.

ERSATZBLATT

Aus Int. J. Food Microbiol. 4 (1987), 249-256 ist ein Verfahren zur Bestimmung von *Listeria monocytogenes* bekannt, bei dem der Mikroorganismus selektiv in flüssigem Medium bei 4°C angereichert, auf speziellen Agarböden gezüchtet und anschließend durch eine Vielzahl biochemischer Tests bio- und serotypisiert wird. Dieses Verfahren ist sehr arbeits- und zeitaufwendig und es dauert 14 Tage und länger bis das Endergebnis vorliegt. Außerdem ist die Beurteilung nur sehr schwierig durchführbar und nicht für Routineuntersuchungen geeignet.

Aus Appl. Environ. Microbiol. 53 (1987), 2256-2259 ist ein Verfahren zur Bestimmung von *Listeria*-Bakterien bekannt, welches durch colony-Hybridisierung mit radioaktiv markierten DNA-probes durchgeführt wird. Die colony-Hybridisierung wäre an sich ein geeignetes Verfahren für eine schnelle und einfache Analyse der Kontamination von Lebensmitteln durch *Listeria*-Bakterien. Dazu ist jedoch eine Nachweis-Nucleinsäure (probe) erforderlich, welche mit allen pathogenen *Listeria*-Bakterien (*L. monocytogenes* und *L. ivanovii*), nicht jedoch mit den anderen *Listeria*-Bakterien hybridisiert. Bisher bekannte DNA-probes (*Listeriolysin* 0, β -*Listeriolysin*; vgl. *Infection and Immunity* 55 (1987), 3225-3227 und *Applied and Environmental, Microbiology* 53 (1987), 2256-2259) sind zu unspezifisch und ergeben demzufolge eine nicht akzeptable Anzahl falsch-positiver und falsch-negativer Ergebnisse.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es demnach, eine Nucleinsäure bereitzustellen, mit welcher spezifisch Hybridisierungstests auf pathogene *Listeria*-Bakterien möglich sind sowie hiervon abgeleitete Proteine, welches als Immunogene zur Herstellung von Antikörpern gegen pathogene *Listeria*-Bakterien geeignet sind.

Diese Aufgabe wird durch eine Nucleinsäure gelöst, die bei den Hybridisierungsbedingungen 5 - 6 x SSC und 42 - 60°C mit dem 2,5kb großen KpnI-BamHI Fragment aus dem Plasmid pLM63 (DSM 5220), vorzugsweise innerhalb einer Stunde, hybridisiert. Vorzugsweise ist die Nucleinsäure mindestens 27 Nucleotide lang. Ebenfalls bevorzugt ist eine Nucleinsäure, welche unter diesen Bedingungen mit der in dem oben genannten Fragment enthaltenen Nucleinsäuresequenz gemäß Tabelle III hybridisiert. Ebenfalls bevorzugt ist eine Nucleinsäure, welche unter diesen Bedingungen mit der Nucleinsäure entsprechend Nucleotid 822 - 1890 aus Tabelle III hybridisiert. Besonders bevorzugt wird die Nucleinsäure der Sequenz nach Tabelle III, ein Fragment dieser Sequenz von Nucleotid 1 - 714, 822 - 1890, 935 bis 1244, von 1158 bis 1185 oder von 1209 bis 1718 oder ein mindestens 27 Nucleotide langes Fragment der Sequenz nach Tabelle III verwendet. Die maximale Länge der Probe ist unkritisch. Üblicherweise sollte sie jedoch die Länge des pLM63-Fragments, also 2,5kb, nicht wesentlich überschreiten.

Unter Nucleinsäuren im Sinne der Erfindung sind Oligodesoxyribonukleoside oder die entsprechenden Oligoribonucleoside sowie deren zur Hybridisierung geeignete Derivate zu verstehen.

Der Listeria-Nachweis erfolgt nach den dem Fachmann geläufigen molekularbiologischen Techniken der DNA/DNA, RNA/RNA bzw. RNA/DNA-Hybridisierung zum Nachweis homologer Nucleinsäuresequenzen. Dazu werden üblicherweise die Methoden der colony- oder plaque-Hybridisierung und blotting-Verfahren (z. B. Southern blot und dot blot) verwendet. Weitere bekannte Verfahren sind in USP 4 358 535, Gene 21 (1983) 7785, EP-B 130515, EP-B 70685, EP-B 70687 und EP-A 238332 beschrieben.

ERSATZBLATT

Die Markierung der probe erfolgt beispielsweise mit radioaktiv derivatisierten Desoxyribonucleosidtriphosphaten, nicht-radioaktiv mit Biotin, Avidin, Streptavidin, einem Fluoreszenzfarbstoff oder einem Hapten. In letzterem Fall erfolgt der Nachweis des Hybridisierungsprodukts durch Bestimmung der enzymatischen Aktivität des Markerenzym in einem Anti-Hapten-Antikörper-Enzym-Konjugat über gekoppelte Farbstoffsysteme. Weitere Verfahren sind beispielsweise in der DE-A 38 13 278 und der DE-A 38 00 644 beschrieben. Die Substanz, mit der die probe markiert ist, wird dort auch als Reportergruppe bezeichnet.

Die Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens erfolgt vorzugsweise dadurch, daß die erfindungsgemäßen Nucleinsäureprobe radioaktiv, mit Biotin, Streptavidin, Avidin oder mit einem Hapten markiert und anschließend Hybridisierung und Bestimmung der Markierung durchgeführt wird.

Zur Markierung der erfindungsgemäßen probes können verschiedene Methoden angewendet werden, wie sie beispielsweise in Molecular Cloning, Maniatis et al (1982), Cold Spring Habor Laboratory, Cold Spring Habor, New York, beschrieben sind. Der Einbau vom Biotin in Nucleinsäuren ist beispielsweise in PNAS USA 78 (1981) 6633 und PNAS USA 79 (1982) 7331 beschrieben. Eine weitere Methode zum Einbau von Reportergruppen ist in EP-A 292128 beschrieben.

ERSATZBLATT

Die radioaktive Markierung kann nach den bekannten Verfahren durchgeführt werden. Der Einbau eines Haptens kann beispielsweise enzymatisch, chemisch oder photochemisch erfolgen. Die Herstellung der Oligonucleotid-probes kann beispielsweise nach der "Random-primed" Methode (Anal. Biochem. 132 (1983) 6) der "Specific-primed" Methode, der "Reversen transcriptions" Methode (Stelow, J.K. und Holländer A. eds, Genetic Engineering, Plenum Press New York and London, Vol. 1, Seite 1) nach der "Fill in" der "Nick-Translation" Methode (J. Mol. Biol. 113 (1977) 237) der "Tailing" Methode, der "Transcriptions" Methode (J. Mol. Biol. 166 (1983) 477), der photochemischen Methode (Nucl. Acids Res. 13 (1985) 745 - 761) oder chemisch durchgeführt werden. Diese Methoden sind beispielsweise in der DE-A 38 13 278 näher beschrieben.

Das zu untersuchende Material (sample) wird vor Durchführung der Bestimmung in üblicher Weise aufbereitet. Vorteilhaft wird dabei die RNA und/oder DNA aus der sample nach bekannten Verfahren isoliert (vgl. z. B. Maniatis, Molecular Cloning (1982) 280 - 281).

Vor Durchführung der Bestimmung können die Nucleinsäuren der sample in kürzerkettige Fragmente gespalten werden. Dies kann beispielsweise durch Ultraschallbehandlung, Mikrowellenbehandlung oder Behandlung mit Restriktionsendonucleasen geschehen. Falls die samples doppelsträngige Nucleinsäuren enthalten, müssen diese vor Durchführung der Bestimmung in Einzelstränge gespalten werden. Dies kann nach den dem Fachmann geläufigen Methoden durch Denaturierung (z.B. Hitzebehandlung oder alkalische Behandlung) erfolgen.

Die derivatisierte oder radioaktiv markierte Nucleinsäureprobe wird mit einer auf einen Träger gebundenen denaturierten DNA oder RNA der zu untersuchenden sample in Kontakt gebracht und hierbei Temperatur, Ionenstärke, pH-Wert, Puffer und sonstige Bedingungen, abhängig von der Länge der Nucleinsäureprobe und der daraus resultierenden Schmelztemperatur des zu erwartenden Hybrids so gewählt, daß die markierte Nucleinsäure an homologe Nucleinsäuren binden kann (J. Mol. Biol. 98 (1975), 503, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76 (1979) 368 3). Besonders geeignete Hybridisierungsbedingungen sind 5-6 x SSC bei 42°C - 60°C und eine Inkubationsdauer von 1 bis 20 Stunden, vorzugsweise 1 Stunde. Besonders geeignete Waschbedingungen sind 0,1 - 0,5 x SSC bei 65°C - 70°C und eine Inkubationsdauer von 15 Minuten bis zwei Stunden, vorzugsweise 30 Minuten. Zur Durchführung der Bestimmung ist es jedoch auch möglich, andere Bedingungen zu wählen, da die optimalen Bedingungen von der Art und Konzentration der probe und der zu bestimmenden Nucleinsäure abhängig sind. So kann beispielsweise durch Zusatz von 40 % Formamid eine niedrigere Hybridisierungstemperatur verwendet werden. Ebenso kann ein organisches Lösungsmittel in einer Konzentration bis zu 50%, vorzugsweise 20-50%, zugesetzt werden. Geeignete Hybridisierungsbedingungen lassen sich, wie in Anal. Biochem. 178(1984) 267, beschrieben, aus Länge der probe, Salzgehalt des Reagenzes, GC-Gehalt der probe und Temperatur berechnen. Als besonders geeignete Bedingungen haben sich erwiesen:

GC-Gehalt der probe 43% - 60%,
Länge der probe mindestens 27 Nucleotide,
Hybridisierung bei 42°C - 60°C und
bei 5 - 6 x SSC über 1 Stunde,
waschen bei 65°C - 70°C und
bei 0,1 - 0,5 x SSC über 30 Minuten,
ggf. unter Zusatz von
40% bis 50% Denaturierungsmittel (z. B. Formamid)
während der Hybridisierung

Unter 1 x SSC ist eine wäßrige Lösung zu verstehen aus

0,15 mol/l NaCl

0,015 mol/l Na₃ Citrat x 2 H₂O,

welche mit 1 mol/l HCl auf pH 7 eingestellt ist. Angaben wie 0,1 x SSC sind entsprechende Verdünnung dieser Lösung.

Als Träger geeignet sind Membranen oder Trägermaterialien auf Basis Nitrocellulose (z.B. Schleicher und Schüll BA85, Amersham Hybond C), verstärkte oder gebundene pulverförmige Nitrocellulose oder mit verschiedenen funktionellen Gruppen (z.B. Nitrogruppe) derivatisierte Nylonmembranen (z.B. Schleicher und Schüll Nytran, NEN Gene Screen, Amersham Hybond N, Pall Biodyne). Vor Durchführung der Bestimmung wird der Träger vorzugsweise vorbehandelt, um nichtspezifische Bindungen der probes an den Träger zu verhindern. Für diese Vorhybridisierung geeignete Blockierungssubstanzen sind beispielsweise phosphate buffered saline mit Rinderse-rumalbumin, nichtionische Detergentien, Polyanionen und DNA aus Heringssperma. Nitrocellulosefilter und Nylonmembranen werden vorzugsweise mit 5 x SSC bei 65°C 1 Stunde vorbehandelt.

Nach Durchführung der Inkubation wird der Träger gewaschen, um unhybridisierte Nucleinsäuren zu entfernen. Dies kann beispielsweise erfolgen durch eine Lösung von 0,1 - 1 % (v/v) eines ionischen Detergenz, ggf. unter Zusatz von Salz (z. B. Natriumchlorid oder Natriumcitrat) oder mit SSC, vorzugsweise 0,1 - 0,5 x SSC.

Bei Verwendung von radioaktiv markierten probes wird eine Autoradiographie durchgeführt.

ERSATZBLATT

Bei Verwendung von Hapten-markierten probes wird mit einem Antikörper oder Antikörperfragment gegen das Hapten inkubiert. Der Antikörper trägt hierbei eine Markierung, beispielsweise eine radioaktive oder enzymatische Markierung. Nach der Antikörper-Inkubation wird nochmals gewaschen, um nur spezifisch gebundene Antikörper-Konjugate nachzuweisen. Die Bestimmung erfolgt dann über die Markierung des Antikörpers oder des Antikörperfragments nach den an sich bekannten Methoden. Entsprechendes gilt für eine Biotin- oder Avidinmarkierung.

Die Markierung des Anti-Hapten-Antikörpers oder des Antikörper-Fragments erfolgt in an sich bekannter Weise. Geeignet sind z. B. Enzymmarkierung, radioaktive Markierung, (Bio)Lumineszenz-Markierung oder Fluoreszenzmarkierung. Bevorzugt wird jedoch eine Enzymmarkierung mit Enzymen, wie alkalische Phosphatase, Peroxidase oder β -Glactosidase verwendet. Besonders bevorzugt wird als Markierungsenzym alkalische Phosphatase verwendet. Die Bestimmung der alkalischen Phosphatase erfolgt über Leukosysteme, insbesondere über indigoide Systeme als oxidierbare Verbindungen (vgl. EP-A 0228663). Als Oxidationsmittel dienen Tetrazoliumsalze. Bei dem Markierungsenzym alkalische Phosphatase wird als Redoxsystem bevorzugt X-Phosphat/Nitroblau-Tetrazolium eingesetzt (F.P. Altmann, Tetrazoliumsalts and Formazans, Progr. Histochem. Cytochem. vol. 913 (1976), Gustav-Fischer-Verlag Stuttgart, Seite. 1). Unter X-Phosphat ist hierbei 5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat und unter Nitroblau-Tetrazolium 3,3'-(3,3'-Dimethoxy-4,4'-biphenylen)-bis-5-phenyl-2-(4-nitrophenyl)-tetrazoliumchlorid zu verstehen. Alkalische Phosphatase spaltet das chromogene Substrat (X-Phosphat), das durch die Abspaltung des Phosphats und Oxidation ein blaues, schwerlösliches Dimäres bildet, welches gleichzeitig die Tetrazoliumverbindung zu einem ebenfalls blauen, schwerlöslichen Formazan reduziert wird.

Der Nachweis der anderen geeigneten Markierungssysteme wird nach an sich bekannten Methoden durchgeführt.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Reagenz zur Bestimmung von Listeriosis, welches dadurch gekennzeichnet ist, daß es eine markierte Nucleinsäure, die mindestens eine Länge von 27 Nucleotiden hat und bei 5 - 6 x SSC und 42°C - 60°C mit dem 2,5kb großen KpnI-BamHI Fragment aus dem Plasmid pLM63 (DSM 5220) hybridisiert. Bevorzugt ist ein Reagenz, welches eine markierte Nucleinsäure enthält, welche mit einer Nucleinsäure gemäß Tabelle III unter den oben genannten Bedingungen hybridisiert. Weiter bevorzugt ist ein Reagenz, welches eine markierte Nucleinsäure enthält, welche mit einer Nucleinsäure entsprechend den Nucleotiden 822 - 1890 aus Tabelle III unter den oben genannten Bedingungen hybridisiert. Vorzugsweise beträgt die Hybridisierungsdauer 1 - 20 Stunden, besonders bevorzugt 1 Stunde. Außerdem enthält das Reagenz ein Detektionssystem für die Markierung. Zur Markierung können die oben beschriebenen Verfahren verwendet werden.

Vorzugsweise wird eine markierte Nucleinsäure entsprechend der Sequenz von Tabelle III oder entsprechend den Nucleotiden 1 - 714, 822 - 1890, 935 bis 1244, 1158 bis 1185 oder 1209 bis 1718 verwendet.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Protein, welches zu mindestens 80 % homolog zu der in Tabelle III angegebenen Aminosäuresequenz Protein I, Protein II oder Protein III ist. Bevorzugt ist ein Protein, welches zu mindestens 80% homolog zu Protein II ist. Dieses Protein hat ein Molekulargewicht von 18 kD. Die Proteine sind dazu geeignet, Antikörper gegen *Listeria* herzustellen. Bevorzugt sind die Proteine mit der Aminosäuresequenz gemäß Tabelle III oder den Teilsequenzen Protein I, Protein II oder Protein III. Besonders bevorzugt ist Protein II.

ERSATZBLATT

Mit dem gegebenenfalls modifizierten erfindungsgemäßen Protein lassen sich durch Immunisierung von Versuchstieren, Gewinnung von Antiserum und Reinigung der Antikörper nach ansich bekannten Verfahren Antikörper und Antiseren gegen pathogene Listeria-Bakterien erhalten. Monoklonale Antikörper können erhalten werden durch Immunisierung von Versuchstieren mit gegebenenfalls modifiziertem erfindungsgemäßen Protein, Fusion von B-Lymphozyten der so erhaltenen immunisierten Tiere mit transformierenden Agentien, Klonierung und Kultivierung der so gebildeten Hybridzellen, welche den monoklonalen Antikörper produzieren und Isolierung des letzteren. Besonders geeignete Tiere für die Herstellung der Antikörper sind Ratten und Mäuse. Geeignete Modifizierungsmittel sind beispielsweise N-Bromsuccinimid (NBS) unter Oxidation von Tryptophangruppen am Protein (BBA 143 (1967) 462-472) Carboximethylierung mit Jodacetat (IAA) die hauptsächlich am Histidin angreift bzw. Nitrierung mit Tetranitromethan (TNM) (J.Biol.Chem. 238 (1963) 3307) sowie die Azotierung mit diazotierter Sulfanylsäure (Meth.Enzymol. 25 (1972) 515-531). Besonders geeignete Versuchstiere sind Balb/c-Mäuse oder AJ-Mäuse.

Die Immunisierung erfolgt durch übliche Verabreichung des nativen oder modifizierten Enzyms, vorzugsweise in Kombination mit Adjuvans. Bevorzugt wird als Adjuvans Freund'sches Adjuvans oder Aluminiumhydroxid zusammen mit Bordetella pertussis verwendet. Die Immunisierung erfolgt üblicherweise über mindestens 2, vorzugsweise 4 Monate.

Zur Gewinnung monoklonaler Antikörper werden nach erfolgter Immunisierung die B-Lymphozyten der immunisierten Tiere nach üblichen Methoden mit transformierenden Agentien fusioniert. Beispiele für transformierende Agentien, die im Rahmen der Erfindung verwendet werden, sind Myelomazellen, transformierende Viren, wie z. B. Epstein-Barr Virus oder die in der DE-A 32 45 665 beschriebenen Agentien. Die Fusionierung erfolgt nach dem bekannten Verfahren von Köhler und Milstein (Nature 256 (1975) 495-497). Die hierbei gebildeten Hybridzellen werden in üblicher Weise kloniert, z. B. unter Verwendung eines handelsüblichen Zellsorters und die erhaltenen Klone, welche den gewünschten monoklonalen Antikörper bilden, gezüchtet. Die Herstellung und Selektion von monoklonalen Antikörpern ist beispielsweise in J.Immunol.Meth., 39 (1980) 285-308 ausführlich beschrieben.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein immunologisches Verfahren, zur Bestimmung von Listeria-Bakterien, bei dem mindestens ein ggf. monoklonaler oder polyklonaler Antikörper gegen das erfindungsgemäße Protein verwendet wird. Als immunologische Bestimmungsmethoden eignen sich im Prinzip alle gängigen Immuno-assays, wie z.B. Radio-Immunoassay, Enzym-Immunoassay, Fluoreszenz-Immunoassay u.s.w.. Ferner sind sämtliche Verfahrensvarianten, wie z.B. kompetitiver Immuno-assay JEMA-Verfahren anwendbar. Zur Markierung eignen sich die für die jeweilige Bestimmungsmethode üblichen Mittel. So werden bei einem Radio-Immunoassay Radio-Isotope, beispielsweise ^{125}J , zur Markierung verwendet. Für einen Enzym-Immunoassay sind sämtliche hierfür üblicherweise eingesetzten Enzyme, beispielsweise Peroxidase oder β -Galactosidase, geeignet. Für eine Fluoreszenz-Immunoassay sind die üblichen fluoreszierenden Gruppen als Markierung brauchbar. Einzelheiten dieser verschiedenen Testmethoden und Verfahrensvarianten sind dem Fachmann bekannt.

ERSATZBLATT

In dem Bestimmungsverfahren können die monoklonalen oder polyklonalen Antikörper als solche oder Fragmente hiervon, welche die entsprechenden immunologischen Eigenschaften aufweisen, beispielsweise Fab-Fragmente, verwendet werden.

Die folgenden Beispiele und die Abbildungen erläutern die Erfindung weiter. Sofern nichts anderes vermerkt, sind alle Prozentangaben Gewichtsprozentangaben. Tabelle III zeigt die DNA-Sequenzen von dth 18 (Nucleotid 822 - 1890) und eines bevorzugten Ausschnittes aus dem 2,5 kb großen KpnI-BamHI Fragment von Plasmid pLM63 (Nucleotid 1 - 1890) sowie die Aminosäuresequenzen der Proteine I, II und III einschließlich Startcodon.

Beispiel 1

Markierung der DNA-probes

200 ng der isolierten DNA werden ^{32}P -markiert, wie in Anal. Biochem. 132 (1983), 6-13 beschrieben.

ERSATZBLATT

Beispiel 2

Probenvorbereitung

2.1 Mikroorganismen

Die verwendeten Referenzstämme sind in Tab. Ia aufgelistet. Alle anderen Listeria-Stämme (Tabellen Ib, II) wurden aus einer Sammlung von etwa 3000 Listeria-Stämmen des National Institute of Public Health and Environmental Protection, Bilthoven, ausgewählt. Unter den geprüften Stämmen befinden sich 40 Stämme, die von an Listeriose erkrankten Patienten stammen. Diese Stämme wurden, wie in Zbl. Bact. I Abt. Orig. A 246 (1980), 211 - 227 beschrieben, isoliert. Die Mikroorganismen wurden in einem flüssigen Selektions- und Anreicherungsmedium (pH 7,0 1g/l Pepton, 8,5g/l NaCl, 10µg/ml, Trypaflavin-HCl, 10µg/ml Nalidixinsäure, 50µg/ml Cyclohexamid) über 24 Stunden bei 30°C gezüchtet und anschließend auf Spezialnährboden (Anreicherungsmedium + 1% Agar) ausplattiert. Nach Bebrütung bei 30 °C über 24 Stunden werden diese Platten direkt in dem Hybridisierungstest eingesetzt.

2.2 Anderes Probenmaterial

Als weiteres Probenmaterial wird eingesetzt Cerebrospinalflüssigkeit, faeces, Blut, Lochia, Gehirnmateriel, Leber, Cervixmaterial, Amnionfluid, Lebensmittel, Silagegras und Tiermaterial. Von diesem Material werden 20 g in 250 ml phosphate buffered saline suspendiert, homogenisiert und weiter aufgearbeitet, wie in International Journal of Food Microbiology 4 (1987), 249 - 256 beschrieben. 0,1 ml der Probe werden auf nichtselektive Agarplatten (85 mm Durchmesser) ausplattiert und über Nacht inkubiert.

ERSATZBLATT

2.3 Durchführung eines Hybridisierungstests mit einer DNA-probe (dth 18, 1069 Nucleotide oder pLM63, 1890 Nucleotide, Tabelle III)

Von den nach 2.1 bzw. 2.2 hergestellten Platten wird mit Nylonmembranen (Gene Screen plus membranes^R, DuPont Corp., USP 4,455,370) ein Abklatsch hergestellt. Die Membranen werden auf Filterpapier gelegt, welches mit 0,5 mol/l NaOH getränkt ist und für 5 Minuten im kochenden Wasserbad inkubiert. Anschließend werden die Membranen auf Filterpapier gebracht, welches mit 1 ml frischer 0,5 mol/l NaOH getränkt ist und mit 1 ml 1 mol/l Trispuffer (pH 7,5) neutralisiert. Dieser Neutralisationsschritt wird wiederholt. Die Membranen werden in 100 ml 5 x SSC getaucht und dabei mit einem Tuch die Zellreste abgerieben. Nach Lufttrocknung werden die Membranen über 6 - 16 Stunden bei 40°C mit 15 ml Lösung A vorhybridisiert. Anschließend wird die DNA-probe dth 18 oder pLM63 (0,05 µg in 2,5 ml, 5 x SSC) zugegeben bei 60°C für 18 Stunden inkubiert. Anschließend wird 45 min mit 0,2 x SSC, welches zusätzlich 1% SDS und 0,1 % Natriumpyrophosphat enthält, im Wasserbad bei 65°C gewaschen. Nach Trocknung werden die Membranen in Plastikfolie eingeschweißt und damit bei -70°C über 18 Stunden ein Röntgenfilm belichtet.

2.4 Hybridisierung mit einer 314bp DNA-probe

Hybridisierungstests werden mit einer verkürzten probe (Nucleotid 1209 - 1718 (vgl. Tabelle III) durchgeführt. Die Hybridisierungsbedingungen sind 5 x SSC bei 42°C (1 Stunde) und anschließendes Waschen in 0,2 x SSC bei 70°C (30 Minuten). zu sehen. Es zeigt sich, daß auch diese probe als DNA-probe zur Prüfung auf Listeriose geeignet ist.

ERSATZBLATT

Reagentien:

1 x SSC: 0,15 mol/l NaCl und 0,015 mol/l Natriumcitrat

Lösung A:

50 mmol/l Trispuffer, pH 7,5,

10 mmol/l EDTA

1 mol/l NaCl

0,2 % Ficoll

0,2 % Polyvinylpyrrolidon

0,2 % Rinderserumalbumin

1 mg/ml denaturierte Heringssperma-DNA

1 % Natriumpyrophosphat und

10 % SDS (Natriumdodecylsulfat).

Zur weiteren Überprüfung wurde noch mit weniger stringenten Bedingungen (2 x SSC bei 65°C) gearbeitet. Dabei ergaben sich analoge Ergebnisse.

Beispiel 3

Vergleichsversuche mit einer DNA-probe nach dem Stand der Technik (Listerolysin 0)

Es wurde als probe ein synthetisches 19 mer-oligomer (⁵GATCACTCTGGAGGATACG³) verwendet (analog Infection and Immunity (56 (1988), 766 - 772)

200 ng dieser DNA-Probe wurde am 5'-Ende mit ³²P-markiert, wie in Maxam und Gilbert (Meth. Enzymol. 65 (1980, 499) beschrieben.

Die Hybridisierungsbedingungen waren:

6 x SSC bei 37°C, dreimaliges Waschen mit 6 x SSC, enthaltend 1 % SDS und 0,1 % Natriumpyrophosphat für jeweils 30 min bei 40°C.

Beispiel 4

Biotypisierung der verwendeten Mikroorganismen

Die Biotypisierung wurde, wie in An. Inv. Pasteur/ Microbiol. 134 (1983) 56 - 71 beschrieben, durchgeführt. Die Stämme wurden in 4 ml halbfestem Peptonagarmedium, welches 1 % D-Xylose oder L-Ramnose enthält, zwei Tage bei 37°C angezogen. Das Peptonmedium besteht aus 10 g Bacto-Pepton, 5 g Natriumchlorid, 5,5 Oxoidagar L 28 und 0,08 g Bromthymolblau aufgelöst in 1000 ml destilliertem Wasser, pH 7,8, autoklaviert bei 120°C für 15 min. Nach Autoklavieren wird filtersterilisierte Zuckerlösung zugegeben bis zu einer Endkonzentration von 1 %. Zur Biotypisierung wurde die Hämolyseproduktion geprüft durch Züchtung der Stämme über Nacht bei 37°C in Brain Heart-Infusionsbrühe. Von dieser Kultur werden 0,2 ml entnommen und mit 0,2 ml einer 2 %igen Schaferythrozytensuspension in PBS (Phosphat buffered saline), welche dreimal gewaschen wurde, zugegeben. Nach zweistündiger Inkubation bei Raumtemperatur wird auf Hämolyse geprüft. *L. monocytogenes*, NCTC7973 und *L. innocua*, NCTC11289 dienen als positive und negative Kontrollen.

Die Biotypisierung erfolgt nach Zbl. Bakt. Mikrobiol. Hyg. I Abt. Orig. A 259 (1985) 341 - 350.

Beispiel 5

Serotypisierung

Die Serotypisierung wurde, wie in Seeliger und Höhne (Zbl. Bact. Microbiol. Hyg. I Abt. Orig. A, 259 (1985), 341-350 beschrieben, durchgeführt.

Die Stämme wurden in 4 ml Tryptonphosphat-Brühe, welche mit 1 % Glucose angereichert ist, angezüchtet und im Wasserbad bei 37°C für 6 - 7 Stunden geschüttelt. Mit dieser Kultur wird eine Tryptoseagarplatte inokuliert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Parallel wird ein zweites Röhrchen mit Tryptosephosphat-Brühe, welcher 1 % Glucose zugegeben wird, inokuliert und bei 25°C unter Schütteln über Nacht im Wasserbad inkubiert. Die Tryptosephosphat-Platte wird mit 5 ml phosphate buffered saline, pH 7,4 geerntet, eine Stunde im kochenden Wasserbad erhitzt und anschließend zentrifugiert.

Die Zellen werden resuspendiert und auf eine Konzentration von 5×10^8 Zellen/ml eingestellt (1×10^9 Zellen/ml haben eine OD von 1,0 bei 600 nm). Von dieser Suspension werden 0,2 ml entnommen und zu 0,2 ml 75fach verdünntem Antiserum gegen die Polysaccharid-Antigene I, II, V, VI, VIII und IX im Glasröhrchen gegeben und bei 45°C für zwei Stunden inkubiert. Anschließend wird abgekühlt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Anschließend werden die Röhrchen auf sichtbare Agglutination geprüft.

Die Serotypisierung erfolgt, wie in Bergeys Manual of Bacteriology (N.R.Kreig, J.G.Holt (eds) Bergeys Manual of Systematic Bacteriology (1984), Williams and Wilkins, Baltimore and London) näher beschrieben. Es wurde in die Serotypenklassen 1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4b, 4d, 4a/b, 5, 6b und 7 eingeteilt.

Beispiel 6

Maus-Bioassay

Zur Überprüfung, ob ein Listeriosis-Stamm pathogen ist, wird ein Maus-Bioassay durchgeführt, wie in Infect. Immun. 45 (1984), 234 - 241 beschrieben, durchgeführt. Dazu werden 10^4 - 10^5 Bakterien in 200 μ l phosphate buffered saline pH 7,4 intravenös in die Maus injiziert. Nach 2 - 4 Tagen werden die Mäuse getötet und die Milz entnommen. Als pathogen wird ein Stamm dann bezeichnet, wenn die Anzahl der Bakterien, die in der gesamten Milz gefunden werden, 10^4 übersteigt.

Beispiel 7

Herstellung von Listeria Antikörpern

50 μ g des gereinigten Antigens (Aminosäuresequenz Tabelle III) werden in complete Freund'schem Adjuvans intramuskulär (IM) injiziert. Drei Wochen, 30 und 40 Tage später wird die Injektion wiederholt. 10 Tage nach der letzten Injektion wird Antiserum gewonnen und affinitätschromatographisch gereinigt.

Mit diesem Antiserum kann ein Immunoblot zur Bestimmung von Listeria durchgeführt werden.

ERSATZBLATT

Beispiel 8

Überprüfung der Eignung einer probe für eine Listeria-Bestimmung

Mit einem Plasmid auf Basis von pUC18, welches die DNA-Sequenz nach Tabelle III insertiert enthält, werden E.coli HB 101 (DSM 1607) transformiert und in Gegenwart von 50 µg/ml Ampicillin, bis zu einer optischen Dichte von OD 600nm = 1 über Nacht gezüchtet. 0,1 ml dieser Kulturbrühe werden aus Agarplatten, die 50µg/ml Ampicillin enthalten (85 mm Durchmesser) ausplattiert und über Nacht inkubiert.

Von den so hergestellten Platten wird mit Nylonmembranen (Gene Screen Plus-Membranes[®], DuPont) ein Abklatsch hergestellt.

Die Membranen werden auf Filterpapier gelegt, welches mit 0,5 mol/l NaOH getränkt ist und für 5 Minuten im kochenden Wasserbad inkubiert. Anschließend werden die Membranen auf Filterpapier gebracht, welches mit 1 ml frischer 0,5 mol/l NaOH getränkt ist und mit 1 ml 1 mol/l Trispuffer, pH 7,5, neutralisiert. Dieser Neutralisationsschritt wird wiederholt. Die Membranen werden in 100 ml 5 x SSC getaucht und dabei mit einem Tuch die Zellreste abgerieben. Nach Lufttrocknung werden die Membranen über 6 - 16 Stunden bei 40°C mit 15 ml Lösung A vorhybridisiert. Anschließend wird die auf Eignung zu überprüfende DNA-probe (0,05 µg in 2,5 ml) zugegeben und bei 60°C für 18 Stunden inkubiert. Anschließend wird 45 Minuten in 0,2 x SSC, welches zusätzlich 1 % SDS und 0,1 % Natriumpyrophosphat enthält, im Wasserbad bei 65°C gewaschen. Nach Trocknung werden die Membranen in Plastikfolien eingeschweißt und damit bei minus 70°C über 18 Stunden ein Röntgenfilm belichtet. Wenn auf dem Röntgenfilm Signale ersichtlich sind, die von einer Hybridisierung stammen, ist diese probe zur Verwendung im Listeriosistest geeignet. Analoge Ergebnisse werden erhalten, wenn als Plasmid pLM63 (DSM 5220) verwendet wird.

Beispiel 9

Vergleich der Hybridisierung einer erfindungsgemäßen probe und einer Vergleichsprobe (vgl. Beispiel 3) mit verschiedenen Listeriosis-Stämmen. Die Hybridisierung wurde wie in Beispiel 2 und 3 beschrieben durchgeführt.

Die Ergebnisse zeigen Tabelle I und II.

Tabelle I

Vergleich der Hybridisierung einer erfindungsgemäßen DNA-probe (1) (935bp bis 1244bp von Tabelle III) und einer DNA-probe nach dem Stand der Technik (Listeriolysin O, (2), hergestellt nach Beispiel 3) mit DNA aus Listeria-Stämmen.

Analoge Ergebnisse werden mit Nucleotid 1 - 714 als DNA-Probe (1) erzielt. Zusätzlich hybridisiert diese Probe noch mit DNA aus Listeria monocytogenes Stämmen des Serotyps 4a (z.B. NCTC 5214).

Tabelle Ia:
mit Referenzstämmen

Sero- typ	Stamm-Nr. ¹⁾	Biotyp	probe	
			1	2
1/2 a	NCTC7973	<u>L.monocytogenes</u>	+	+
1/2 b	SLCC2755	<u>L.monocytogenes</u>	+	+
	SLCC3954	<u>L.seeligeri</u>	-	-
1/2 c	NCTC5348	<u>L.monocytogenes</u>	+	+

Sero- typ	Stamm-Nr.	Biotyp	probe	
			1	2
3 a	NCTC5105	<u>L.monocytogenes</u>	+	+
3 b	SLCC2540	<u>L.monocytogenes</u>	+	+
3 c	SLCC2479	<u>L.monocytogenes</u>	+	+
4 b	NCTC10527	<u>L.monocytogenes</u>	+	+
4 c	ATCC19116	<u>L.monocytogenes</u>	+	+
4 d	NCTC10888	<u>L.monocytogenes</u>	+	+
4 e	ATCC19118	<u>L.monocytogenes</u>	+	+
4 ab	NCTC10528	<u>L.monocytogenes</u>	+	+
5	ATCC19119	<u>L.ivanovii</u>	+	-
6 a	SLCC 5334	<u>L.welshimeri</u>	-	-
	NCTC11288	<u>L.innocua</u>	-	-
6 b	NCTC11289	<u>L.innocua</u>	-	-
7	SLCC 2482	<u>L.monocytogenes</u>	+	+
	RIVM 1	<u>L.gravi</u>	-	+
	RIVM 2	<u>L.murravi</u>	-	+

1) Hinterlegungstellen vgl. World Directory of Collections of Cultures of Microorganisms edited by V.F. McGowan and V.B.D. Sherman, World Data Center, University of Queensland, Australien, 1982.

Tabelle I b:
mit einer Vielzahl von Stämmen

Anzahl der untersuch- ten Stämme	Biotyp	probe	
		1	2
34	<u>L.monocytogenes</u> (34)	34	34
39	<u>L.monocytogenes</u> (37)	37	37
	<u>L.seeligeri</u> (1)	0	0
	<u>L.welshimeri</u> (1)	0	0
16	<u>L.monocytogenes</u> (16)	16	16
5	<u>L.monocytogenes</u> (5)	5	5
5	<u>L.monocytogenes</u> (3)	3	3
	<u>L.welshimeri</u> (1)	0	0
	<u>L.seeligeri</u> (1)	0	0
2	<u>L.monocytogenes</u> (1)	1	1
	<u>L.innocua</u> (1)	0	0
77	<u>L.monocytogenes</u> (77)	76	76

Anzahl der untersuch- ten Stämme	Biotyp		probe	
			1	2
5	<u>L.seeligeri</u>	(5)	0	0
2	<u>L.monocytogenes</u>	(2)	2	2
1	<u>L.monocytogenes</u>	(1)	1	1
34	<u>L.innocua</u>	(32)	0	1
	<u>L.welshimeri</u>	(2)	0	0
23	<u>L.innocua</u>	(18)	0	2
	<u>L.welshimeri</u>	(5)	0	0
7	<u>L.monocytogenes</u>	(7)	7	7
2	<u>L.gravi</u>	(2)	0	2
3	<u>L.murrayi</u>	(3)	0	3

Tabelle II

Tabelle II zeigt die Hybridisierungsreaktion von probe 1 mit verschiedenen *Listeria*-Stämmen, deren Pathogenität nach Beispiel 6 bestimmt wurde.

Biotyp	Sero- typ	Herkunft	Hybridi- sierung	<u>log Anzahl/g Milz</u> 2. Tag	4. Tag
<u>L.monocytogenes</u>	1/2 a	Referenz- stamm	+	7.4 ^{c)}	8.3 +
<u>L.monocytogenes</u>	1/2 b	Weich- käse	+	6.2	7.1 +
<u>L.monocytogenes</u>	1/2 c	Lebens- mittel	+	5.4	+ +
<u>L.monocytogenes</u>	3a	Lebens- mittel	+	6.4	6.5
<u>L.monocytogenes</u>	3 b	Lebens- mittel	+	8.4	+ +
<u>L.monocytogenes</u>	3 c	Lebens- mittel	+	8.2	+ +
<u>L.monocytogenes</u>	4 b	Weich- käse	+	7.0	+ +
<u>L.monocytogenes</u>	4 b	Weich- käse	+	6.5	+ +
<u>L.monocytogenes</u>	4 b	Weich- käse	+	8.3	+ +
<u>L.seeligeri</u>	4 c	Lebens- mittel	-	<2.0	<2.0.

Biotyp	Sero- typ	Herkunft	Hybridi- sierung	<u>log Anzahl/g Milz</u>	
				2. Tag	4. Tag
<u>L.innocua</u>	6 a	Weich- käse	-	2.0	3.7
<u>L.innocua</u>	6 b	Weich- käse	-	<2.0	<2.0
<u>L.grayi</u>		Referenz- stamm	-	<2.0	<2.0
<u>L.murrayi</u>		Referenz- stamm	-	<2.0	<2.0

- a) 10^4 - 10^5 Organismen wurden 4 Mäusen injiziert.
b) Hybridisierung wird mit dem dth 18-gene als probe durch-
geführt (vgl. Beispiel 2.3).c) Mittelwert von 2 Mäusen;
+: Maus vor Probenahme gestorben.

Tabelle III

NUCLEOTIDE SEQUENCE OF PLASMID pPLM63

10 20 30 40 50 60
 CTTTTCATTTAGATAAAACAAAAGAAGAAATTGGCGCTTTACCTGCTTCGGCGATTGAAT
 PheHisLeuAspLysThrLysGluGluIleGlyAlaLeuProAlaSerAlaIleGluCys

70 80 90 100 110 120
 GTCAGTATGAGGCTTTTGTGATTAAATGAAGCCAATAATTAAGGAGTGATAAAATGCAGGT
 GlnTyrGluAlaPheValIleAsnGluAlaAsnAsn--- METGlnVal
 ↳ Protein III

130 140 150 160 170 180
 TTTAGTTTACCAGAAAATAAGGATATCAATTATATAAAAACGGTCCAAGAAGTAAAACG
 LeuValLeuProGluAsnLysAspIleAsnTyrIleLysThrValGlnGluValLysArg

190 200 210 220 230 240
 ATTTTTTGGCGATTGAGCGGTTTCGGATGATTACGGGGTTATCAAAAAGCCACATTT
 PhePheAlaAspPheGluArgPheArgMETIleThrGlyLeuSerLysLysProHisLeu

250 260 270 280 290 300
 ACTTAGAAATGGTTTTCTGGAAGAGCCGCAGTTTGAGCCGGTAGCATTTTCTGCTAGACA
 LeuArgAsnGlyPheLeuGluGluProGlnPheGluProValAlaPheSerAlaArgHis

310 320 330 340 350 360
 TAATAAGAAGTCATTTTGAAGCGCGATGGTTGGTAGAGAAATATACTGAAATGTTGAA
 AsnLysGluValIleLeuGluAlaArgTrpLeuValGluLysTyrThrGluMETLeuAsn

370 380 390 400 410 420
 TCAGATGGATGATTTATATCGAACTATTTTGATGGAATGTTACGTGGAACGAAAACAAGA
 GlnMETAspAspLeuTyrArgThrIleLeuMETGluCysTyrValGluArgLysGlnAsp

430 440 450 460 470 480
 TGTGGCGGTAATGATGGATTTACCGTATGAAATTGCCCGAGTTTAAACGGATAAAAAAACG
 ValAlaValMETMETAspLeuProTyrGluIleAlaGlnPheLysArgIleLysLysArg

490 500 510 520 530 540
 GGCAGTGCTAGAACTTGCAACGCTAATGGGGATTTTAGTAAGGAAATGATGATACTTTCG
 AlaValLeuGluLeuAlaThrLeuMETGlyIleLeuValArgLys---

—————→ Protein III

ERSATZBLATT

Tabelle III (Forts.)

550 560 570 580 590 600
 TGATATTTTGAAACATCATTTCCTATTAATATAGAAGTAAGCTAATTGTCCAGTAAGCG
 610 620 630 640 650 660
 GATGACAATAAAAGCTGCATCAGAATGAAGGTGCACCGATTTTCTGATAATACATGATGT
 670 680 690 700 710 720
 TTTACAAGGAATTTGTTTTTATGATTGGATTTAAATCCGTTGAGATAAACAATATTCTA
 730 740 750 760 770 780
 TTTTGGAAAGTAAAGTTCGGAGGAATAAATTATTAAATGTGGTCTTGACCGAACTTTGCT
 790 800 810 820 830 840
 TTCTGTTTTAAAGGAGTGAACGTTTGGTGAAGAGTTTGAGCTTCATGAGAGTTTTGGAAG
 ValLysSerLeuSerPheMETArgValLeuGluAla
 → Protein I
 850 860 870 880 890 900
 CAGTGAGAACAATGCTCCAGGAAAAGGCGGACTAGATATTTCTATTGTAATGCGTGACC
 ValArgThrMETLeuGlnGluLysGlyGlyLeuAspIleSerIleValMETArgAspGln
 910 920 930 940 950 960
 AAGTGGAATGCCTACAACGATGATCGAGATGATTGATCAAGAGGAAGAAGAAAGCCAAA
 ValGluMETProThrThrMETIleGluMETIleAspGlnGluGluGluGluSerGlnThr
 970 980 990 1000 1010 1020
 CTGCCTGGAAAGAAAAATACCGTTTTGCAATCCATCATTATACAAATGAAACGGACTTAG
 AlaTrpLysGluLysTyrArgPheAlaIleHisHisTyrThrAsnGluThrAspLeuAla
 1030 1040 1050 1060 1070 1080
 CGGGAGTCGAAAAGATAGATACGCTTATCCAAACAGGATTCACCTTGCCTGAAGGATACA
 GlyValGluLysIleAspThrLeuIleGlnThrGlyPheThrLeuProGluGlyTyrLys
 1090 1100 1110 1120 1130 1140
 AATTAATCGCTGTTTCGACATTACGGAAAACAAAATTTAGTCAAAGAAAATACGTTAATTC
 LeuIleAlaValArgHisTyrGlyLysGlnAsnLeuValLysGluAsnThrLeuIleHis

1150 1160 1170 1180 1190 1200
ACGCAAAAACCCAGTTTTGAAGTAAGTATTTGTCGTGAATTAAAAGTAAAAATTTAGGGGG
AlaLysThrSerPheGluValSerIleCysArgGluLeuLysValLysIle---
→ Protein I

1210 1220 1230 1240 1250 1260
AAATATTAATGGCATTGAAGAGAATTATATTGTGATTATACACCGGGAGCTGCTAAAG
(METAlaPheGluGluAsnLeuTyrCysAspTyrThrProGlyAlaAlaLysAla
→ Protein II

1270 1280 1290 1300 1310 1320
CGGTCGCGGGGAAAGATGTAATTTTAGCAGTTTTTAACGCAGCGGGGGACAACTATTAG
ValAlaGlyLysAspValIleLeuAlaValPheAsnAlaAlaGlyAspLysLeuLeuAla

1330 1340 1350 1360 1370 1380
CGGTTGCGGGCCAACAAGGTCTAACTGTAAACCGTTCTAAAGATAGCATTGAAATTACAT
ValAlaGlyGlnGlnGlyLeuThrValAsnArgSerLysAspSerIleGluIleThrSer

1390 1400 1410 1420 1430 1440
CTAAAGATACAGTTGGCGGATGGAAATCCAAAATTGGCGGTATGAAAGAATGGTCAATTG
LysAspThrValGlyGlyTrpLysSerLysIleGlyGlyMETLysGluTrpSerIleGlu

1450 1460 1470 1480 1490 1500
AAAATGACGGATTATATGTGCTGATGCAGAGTCTCACAAAGAATTGGCGAAATATTTTCG
AsnAspGlyLeuTyrValAlaAspAlaGluSerHisLysGluLeuAlaLysTyrPheGlu

1510 1520 1530 1540 1550 1560
AAAGTGATAGCCCGGTTTGTGTGAAATCATTAAATCAAGCATCTAAAAAAGGTCTTTTCG
SerAspSerProValCysValLysIleIleAsnGlnAlaSerLysLysGlyLeuPheGly

1570 1580 1590 1600 1610 1620
GTGGTTTGGCAATTGTAGCTGACTATAGTTTGAAGCACCTTTTGACGAAGCGATGACTT
GlyLeuAlaIleValAlaAspTyrSerPheGluAlaProPheAspGluAlaMETThrTyr

1630 1640 1650 1660 1670 1680
ACTCTGTAAACTAGACGGAATGGGCGCGCTTGTTGATTTAACGATTACTGAGGGCGGCG
SerValLysLeuAspGlyMETGlyAlaLeuValAspLeuThrIleThrGluGlyGlyAsp

1690 1700 1710 1720 1730 1740
ACCAAATGCCCGGCGAAACACCTGTAGCACCAGCAGAATAAAATAGAAAGCCACTGAAAT
GlnMETProGlyGluThrProValAlaProAlaGlu---
→ Protein II

- 29 -

Tabelle III (Forts.)

1750	1760	1770	1780	1790	1800
AAGTGGCTTTCCCTTAGGAGGAAAATAAATGTTTGAAGTGAATGATACAACTTATATTTT					
			METPheGluValAsnAspThrThrTyrIleLeu		

1810	1820	1830	1840	1850	1860
ACGATTTAATAAACAAAAAGTTAAACGGTGGAAATTAACATCAGGGATTAGTTT					
					AGTTGC
ArgPheAsnLysGlnLysValLysThrValGluLeuThrSerGlyIleSerLeuValAla					

1870	1880	1890
AGCTTTGACTGCGAATAAAGGGATTTTGAG		
AlaLeuThrAlaAsnLysGlyIleLeu		

ERSATZBLATT

Patentansprüche

1. Nucleinsäure, welche bei den Hybridisierungsbedingungen 5 - 6 x SSC und 42 - 60°C mit dem 2,5kb großen KpnI-BamHI Fragment aus dem Plasmid pLM63 (DSM 5220) hybridisiert.
2. Nucleinsäure nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß sie bei den Hybridisierungsbedingungen 5-6xSSC und 42-60°C mit dem Nucleinsäurefragment nach Tabelle III hybridisiert.
3. Nucleinsäure nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß der GC-Gehalt der Nucleinsäure 43% bis 60% beträgt.
4. Nucleinsäure nach Anspruch 1 bis 3, welche mit einem mindestens 27bp langen Ausschnitt oder der gesamten Nucleinsäure-Sequenz von Tabelle III identisch ist.
5. Nucleinsäure nach Anspruch 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß sie eine Markierung trägt.
6. Nucleinsäure nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß sie radioaktiv, mit Biotin, Avidin, Streptavidin, einem Fluoreszenzfarbstoff oder einem Hapten markiert ist.
7. Verfahren zur Bestimmung von Listeria-Bakterien, dadurch gekennzeichnet, daß die zu untersuchende sample mit einer probe nach Anspruch 4 oder 5 inkubiert wird und die Markierung durch ein geeignetes Nachweissystem bestimmt wird.

-31-

8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Hybridisierung bei einer Hybridisierungstemperatur von 42°C bis 60°C und 5 - 6 x SSC durchgeführt wird.
9. Verfahren nach den Ansprüchen 7 oder 8, dadurch gekennzeichnet, daß nach Hybridisierung bei 65°C bis 75°C gewaschen wird.
10. Protein, welches zu mindestens 80 % homolog zu der Aminosäuresequenz I, II oder III von Tabelle III ist.
11. Protein nach Anspruch 10 mit der Aminosäuresequenz Protein I, Protein II oder Protein III.
12. Verwendung der Proteine nach den Ansprüchen 10 oder 11 zur Herstellung von Antikörpern gegen Listeria-Bakterien.
13. Antikörper erhältlich durch Immunisierung von Versuchstieren mit einem Protein nach den Ansprüchen 10 oder 11.
14. Verwendung von Antikörpern nach Anspruch 13 zur immunologischen Bestimmung von Listeria-Bakterien.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/EP 90/00087

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (if several classification symbols apply, indicate all) ⁶ According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC Int.Cl. ⁵ : C 12 Q 1/68, C 07 K 15/28, C 07 K 13/00, G 01 N 33/569														
II. FIELDS SEARCHED <div style="text-align: center; border-top: 1px solid black; border-bottom: 1px solid black; margin: 5px 0;">Minimum Documentation Searched ⁷</div> <table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 25%; border-bottom: 1px solid black; padding: 5px;">Classification System</td> <td style="border-bottom: 1px solid black; padding: 5px;">Classification Symbols</td> </tr> <tr> <td style="padding: 5px;">Int.Cl.⁵</td> <td style="padding: 5px;">C 12 Q; C 12 N; C 07 K</td> </tr> </table> <div style="text-align: center; border-top: 1px solid black; border-bottom: 1px solid black; margin: 5px 0;">Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched ⁸</div>			Classification System	Classification Symbols	Int.Cl. ⁵	C 12 Q; C 12 N; C 07 K								
Classification System	Classification Symbols													
Int.Cl. ⁵	C 12 Q; C 12 N; C 07 K													
III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT ⁹ <table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <th style="width: 10%; border-bottom: 1px solid black; padding: 5px;">Category ⁹</th> <th style="width: 60%; border-bottom: 1px solid black; padding: 5px;">Citation of Document, ¹¹ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹²</th> <th style="width: 30%; border-bottom: 1px solid black; padding: 5px;">Relevant to Claim No. ¹³</th> </tr> <tr> <td style="border-right: 1px solid black; padding: 5px; vertical-align: top;">P, A</td> <td style="border-right: 1px solid black; padding: 5px; vertical-align: top;">WO, A1, 89/06699 (INSTITUT PASTEUR) 27 July 1989, see the whole document ---</td> <td style="padding: 5px; vertical-align: top;">1-14</td> </tr> <tr> <td style="border-right: 1px solid black; padding: 5px; vertical-align: top;">P, A</td> <td style="border-right: 1px solid black; padding: 5px; vertical-align: top;">EP, A2 0314294 (GENE-TRAK SYSTEMS) 3 May 1989, see the whole document ---</td> <td style="padding: 5px; vertical-align: top;">1-14</td> </tr> <tr> <td style="border-right: 1px solid black; padding: 5px; vertical-align: top;">A</td> <td style="border-right: 1px solid black; padding: 5px; vertical-align: top;">FR, A1, 2616804 (WASHINGTON STATE UNIVERSITY RESEARCH FOUNDATION) 23 December 1988, see the whole document -----</td> <td style="padding: 5px; vertical-align: top;">1-14</td> </tr> </table>			Category ⁹	Citation of Document, ¹¹ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹²	Relevant to Claim No. ¹³	P, A	WO, A1, 89/06699 (INSTITUT PASTEUR) 27 July 1989, see the whole document ---	1-14	P, A	EP, A2 0314294 (GENE-TRAK SYSTEMS) 3 May 1989, see the whole document ---	1-14	A	FR, A1, 2616804 (WASHINGTON STATE UNIVERSITY RESEARCH FOUNDATION) 23 December 1988, see the whole document -----	1-14
Category ⁹	Citation of Document, ¹¹ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹²	Relevant to Claim No. ¹³												
P, A	WO, A1, 89/06699 (INSTITUT PASTEUR) 27 July 1989, see the whole document ---	1-14												
P, A	EP, A2 0314294 (GENE-TRAK SYSTEMS) 3 May 1989, see the whole document ---	1-14												
A	FR, A1, 2616804 (WASHINGTON STATE UNIVERSITY RESEARCH FOUNDATION) 23 December 1988, see the whole document -----	1-14												
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p>¹⁰ Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>"A" document member of the same patent family</p> </div> </div>														
IV. CERTIFICATION <table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 50%; border-bottom: 1px solid black; padding: 5px;">Date of the Actual Completion of the International Search</td> <td style="width: 50%; border-bottom: 1px solid black; padding: 5px;">Date of Mailing of this International Search Report</td> </tr> <tr> <td style="border-bottom: 1px solid black; padding: 5px;">10 April 1990 (10.04.90)</td> <td style="border-bottom: 1px solid black; padding: 5px;">25 April 1990 (25.04.90)</td> </tr> <tr> <td style="border-bottom: 1px solid black; padding: 5px;">International Searching Authority</td> <td style="border-bottom: 1px solid black; padding: 5px;">Signature of Authorized Officer</td> </tr> <tr> <td style="padding: 5px;">EUROPEAN PATENT OFFICE</td> <td></td> </tr> </table>			Date of the Actual Completion of the International Search	Date of Mailing of this International Search Report	10 April 1990 (10.04.90)	25 April 1990 (25.04.90)	International Searching Authority	Signature of Authorized Officer	EUROPEAN PATENT OFFICE					
Date of the Actual Completion of the International Search	Date of Mailing of this International Search Report													
10 April 1990 (10.04.90)	25 April 1990 (25.04.90)													
International Searching Authority	Signature of Authorized Officer													
EUROPEAN PATENT OFFICE														

**ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT
ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO. PCT/EP 90/00087**

SA 33845

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report.
The members are as contained in the European Patent Office EDP file on 28/02/90
The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A1- 89/06699	27/07/89	NONE	
EP-A2- 0314294	03/05/89	AU-D- 2213488	16/03/89
FR-A1- 2616804	23/12/88	NONE	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen **PCT/EP 90/00087**

I. KLASSEFIZKATION DES ANMELDUNGSGEGENSTANDS (bei mehreren Klassifikationssymbolen sind alle anzugeben) ⁶ Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC IPC5: C 12 Q 1/68, C 07 K 15/28, C 07 K 13/00, G 01 N 33/569														
II. RECHERCHIERTE SACHGEBIETE <div style="text-align: right; margin-right: 100px;">Recherchierter Mindestprüfstoff⁷</div> <table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 20%; border: none;">Klassifikationsbereich</td> <td style="border: none;">Klassifikationssymbole</td> </tr> <tr> <td style="border: 1px solid black; padding: 5px; text-align: center;">IPC5</td> <td style="border: 1px solid black; padding: 5px;">C 12 Q; C 12 N; C 07 K</td> </tr> </table> <div style="text-align: center; margin-top: 5px; font-size: small;"> Recherchierte nicht zum Mindestprüfstoff gehorende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Sachgebiete fallen⁸ </div>			Klassifikationsbereich	Klassifikationssymbole	IPC5	C 12 Q; C 12 N; C 07 K								
Klassifikationsbereich	Klassifikationssymbole													
IPC5	C 12 Q; C 12 N; C 07 K													
III. EINSCHLÄGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN⁹ <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 10%; font-size: small;">Art*</th> <th style="width: 70%; font-size: small;">Kennzeichnung der Veröffentlichung¹¹, soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile¹²</th> <th style="width: 20%; font-size: small;">Betr. Anspruch Nr. 13</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center; vertical-align: top;">P, A</td> <td>WO, A1, 89/06699 (INSTITUT PASTEUR) 27 Juli 1989, siehe Dokument insgesamt --</td> <td style="text-align: center; vertical-align: top;">1-14</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; vertical-align: top;">P, A</td> <td>EP, A2, 0314294 (GENE-TRAK SYSTEMS) 3 Mai 1989, siehe Dokument insgesamt --</td> <td style="text-align: center; vertical-align: top;">1-14</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; vertical-align: top;">A</td> <td>FR, A1, 2616804 (WASHINGTON STATE UNIVERSITY RESERACH FOUNDATION) 23 Dezember 1988, siehe Dokument insgesamt -- -----</td> <td style="text-align: center; vertical-align: top;">1-14</td> </tr> </tbody> </table>			Art*	Kennzeichnung der Veröffentlichung ¹¹ , soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile ¹²	Betr. Anspruch Nr. 13	P, A	WO, A1, 89/06699 (INSTITUT PASTEUR) 27 Juli 1989, siehe Dokument insgesamt --	1-14	P, A	EP, A2, 0314294 (GENE-TRAK SYSTEMS) 3 Mai 1989, siehe Dokument insgesamt --	1-14	A	FR, A1, 2616804 (WASHINGTON STATE UNIVERSITY RESERACH FOUNDATION) 23 Dezember 1988, siehe Dokument insgesamt -- -----	1-14
Art*	Kennzeichnung der Veröffentlichung ¹¹ , soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile ¹²	Betr. Anspruch Nr. 13												
P, A	WO, A1, 89/06699 (INSTITUT PASTEUR) 27 Juli 1989, siehe Dokument insgesamt --	1-14												
P, A	EP, A2, 0314294 (GENE-TRAK SYSTEMS) 3 Mai 1989, siehe Dokument insgesamt --	1-14												
A	FR, A1, 2616804 (WASHINGTON STATE UNIVERSITY RESERACH FOUNDATION) 23 Dezember 1988, siehe Dokument insgesamt -- -----	1-14												
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 48%;"> <p>* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen¹⁰:</p> <p>"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist</p> <p>"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist</p> <p>"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)</p> <p>"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht</p> <p>"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist</p> </div> <div style="width: 48%;"> <p>"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist</p> <p>"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden</p> <p>"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist</p> <p>"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist</p> </div> </div>														
IV. BESCHEINIGUNG <table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 50%; border: none;">Datum des Abschlusses der internationalen Recherche</td> <td style="width: 50%; border: none;">Absenddatum des internationalen Recherchenberichts</td> </tr> <tr> <td style="border: 1px solid black; padding: 5px;">10. April 1990</td> <td style="border: 1px solid black; padding: 5px; text-align: center;">25. 04. 90</td> </tr> <tr> <td style="border: none;">Internationale Recherchenbehörde</td> <td style="border: none;">Unterschrift des Bevollmächtigten Bediensteten</td> </tr> <tr> <td style="border: 1px solid black; padding: 5px; text-align: center;">Europäisches Patentamt</td> <td style="border: 1px solid black; padding: 5px; text-align: center;"> J. TAZELAAR </td> </tr> </table>			Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absenddatum des internationalen Recherchenberichts	10. April 1990	25. 04. 90	Internationale Recherchenbehörde	Unterschrift des Bevollmächtigten Bediensteten	Europäisches Patentamt	 J. TAZELAAR				
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absenddatum des internationalen Recherchenberichts													
10. April 1990	25. 04. 90													
Internationale Recherchenbehörde	Unterschrift des Bevollmächtigten Bediensteten													
Europäisches Patentamt	 J. TAZELAAR													

**ANHANG ZUM INTERNATIONALEN RECHERCHENBERICHT
ÜBER DIE INTERNATIONALE PATENTANMELDUNG NR.**

PCT/EP 90/00087

SA 33845

In diesem Anhang sind die Mitglieder der Patentfamilien der im obengenannten internationalen Recherchenbericht angeführten Patentdokumente angegeben.

Die Angaben über die Familienmitglieder entsprechen dem Stand der Datei des Europäischen Patentamts am 28/02/90
Diese Angaben dienen nur zur Unterrichtung und erfolgen ohne Gewähr.

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO-A1- 89/06699	27/07/89	KEINE	
EP-A2- 0314294	03/05/89	AU-D- 2213488	16/03/89
FR-A1- 2616804	23/12/88	KEINE	